

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**Facoltà di Scienza MM.FF.NN.
Laurea di primo livello in Biologia Molecolare**

ELABORATO DI LAUREA

INDAGINI MICROBIOLOGICHE SU VINO ED ACQUA

Tutor:

***Proff.ssa Maria Cristina Parolin
Dipartimento di Microbiologia***

Co-Tutor:

***Dottor Giuseppe Vassanelli
Laboratorio di analisi "Enocentro di Vassanelli C. & C. SRL"***

***Laureando
LUCA SEREN***

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

INDICE:

Abstract

3

1. Introduzione

4

1.1. Gli elementi analizzati

4

1.1.1. Acqua e vino visti come substrato

4

1.2. Generalità, microrganismi ricercati e aspetti legislativi dell'acqua

5

1.1.2. Microrganismi ricercati: indicatori di qualità

5

1.1.3. Legislazione

6

1.3. Generalità, microrganismi ricercati e aspetti legislativi del vino

9

1.1.4. Microrganismi ricercati

10

1.1.5. Legislazione

11

2. Materiali e metodi

12

2.1. Efficacia del metodo di inoculo in piastra per l'analisi dell'acqua

12

2.2. Analisi microbiologica acqua

13

2.3. Analisi BOD e COD acqua

17

2.4. Analisi microbiologica vino

18

3. Risultati e discussione

.....
19

3.1. Efficacia del metodo di inoculo in piastra per l'analisi dell'acqua

.....
20

3.2. Dati Microbiologici di varie tipologie di acque

.....
20

3.3. Analisi della richiesta di ossigeno delle acque: BOD e COD

.....
21

3.4. Dati ottenuti su campioni di vino

.....
22

4. Conclusione

.....
25

ABSTRACT

Lo scopo del presente elaborato sta nel riportare in modo critico quanto fatto nello stage.

Un obiettivo primario è stato quello di mettere in pratica all'interno del laboratorio tutta una serie di procedure tra le quali si sono elette quelle che davano una migliore affidabilità e riproducibilità nelle analisi dei vari campioni d'acqua. Infatti per la prima volta il laboratorio affrontava il problema "analisi acqua" e a me è spettato il compito di organizzare ed affrontare i vari aspetti delle analisi microbiologiche.

Si è voluto verificare se vi fossero risultati microbiologici ideali tra le diverse tipologie di acque e come questi si orientino nel loro interno. Infatti ci si aspetta che un'acqua di acquedotto possa essere meno inquinata di un'acqua di pozzo. Oppure che un'acqua di fognatura sia effettivamente conforme ai limiti prefissati e non sia similmente avvicinabile alle acque di lavaggio di impianti zootecnici. Si è voluto inoltre verificare superficialmente la qualità delle acque di pozzo del territorio Veronese.

Col secondo obiettivo ho affrontato le analisi del settore enologico: confrontando molti campioni di analisi si è cercato di stabilire se esistano dei rapporti tra i microrganismi presenti nel vino con lo scopo di verificare se la presenza di un determinato microrganismo possa essere indicatore di un altro oppure possa essere la causa di uno specifico fenomeno.

1. INTRODUZIONE

La presente tesina è stata portata a sviluppo grazie allo stage svolto durante il periodo di 4 mesi (da Luglio a Novembre 2006) presso il laboratorio di analisi “Enocentro di Vassanelli & C. SPA” di Bussolengo –VR–.

L'attività principale del Laboratorio Enocentro consiste nell'effettuare determinazioni analitiche nel settore chimico-microbiologico alimentare con particolare specializzazione ed attenzione al settore enologico.

Ho avuto la possibilità di fare esperienza mettendo a punto l'analisi microbiologica e chimica dell'acqua.

Ho lavorato anche per le analisi di verifica della presenza di microrganismi nel vino e per il miglior metodo di semina delle piastre nelle analisi routinarie.

1. GLI ELEMENTI ANALIZZATI:

Due elementi inscindibili nella vita dell'uomo. L'acqua e il vino. L'acqua per il suo ovvio valore biologico essenziale alla vita; il vino per il suo carico enorme di tradizioni e usi.

Due liquidi, dunque, che l'uomo consuma abitualmente e che per questo motivo devono sempre essere monitorati per garantirne la potabilità in tutte le sue sfumature.

1.1.1 Acqua e vino visti come substrato:

Acqua e vino sono liquidi che di per sé possono costituire un substrato in cui i microrganismi possono vivere o sopravvivere.

Il vino ad inizio della vinificazione costituisce un ottimo terreno di coltura per lieviti ed alcuni batteri. Infatti la composizione dei mosti ricca di zuccheri, pur inibendo la crescita a molti microrganismi, favorisce la vita a particolari specie di lieviti e batteri. Una volta che il liquido è trasformato in vino, si arricchisce di etanolo (sostanza tossica) che blocca a feedback la catena della fermentazione. Risulta quindi un substrato in cui lo sviluppo dei microrganismi risulta più difficile.

L'acqua è uno dei substrati più semplici, in funzione di quelle che sono le sue specifiche caratteristiche di composizione, che può essere oggetto di indagine microbiologica.

L'acqua costituisce altresì un substrato di facile manipolazione a livello laboratoristico, sul quale si possono più agevolmente studiare e definire determinati aspetti caratteristici della pratica analitica microbiologica. Trattandosi di un composto piuttosto povero di sostanze nutritive per i germi di maggiore interesse a livello umano (specie potenzialmente patogene, specifici indici di contaminazione, ecc.), l'acqua in generale non costituisce per tali microrganismi un substrato favorevole di moltiplicazione, bensì per lo più un veicolo di trasporto da un ambiente ad un altro. In tale veicolo le capacità di sopravvivenza risultano diverse in relazione alle precise caratteristiche di ciascuna specie.

1.2 GENERALITA', MICRORGANISMI RICERCATI E ASPETTI LEGISLATIVI DELL'ACQUA

Considerata l'importanza dell'acqua per gli organismi viventi, per il mantenimento degli equilibri ambientali e, comunque, quale fattore indispensabile in un contesto di evoluzione economico-sociale, il capillare controllo e la garanzia della qualità dell'acqua appaiono un presupposto irrinunciabile che va al di là di qualunque considerazione puramente di tipo tecnico ed analitico.

Inutile affermare che l'acqua è un bene irrinunciabile per qualsiasi essere vivente. Indispensabile per ogni processo metabolico, sia esso batterico oppure di un complesso individuo pluricellulare.

La presenza di elementi a rischio come sostanze nocive oppure microrganismi patogeni in quantità elevate possono alterare l'acqua renderla non più utilizzabile da altri organismi in quanto tossica o/e infetta.

Diverse sono le tipologie di acque esistenti. Vi sono laghi, fiumi, acque di scarico, sorgenti sotterranee. Ognuna di queste acque possiede caratteristiche ben precise che ne determinano la vita che ospitano. Anche per l'uomo, l'acqua è una fonte importantissima ed irrinunciabile e per questo viene tutelata.

1.2.1 Microrganismi ricercati: indicatori di qualità

Dalla difficoltà di utilizzare tecniche di routine per la ricerca di tutti i possibili microrganismi patogeni, è sorta la necessità di individuare, per la definizione della qualità di un'acqua, microrganismi indicatori di contaminazione, la cui presenza può essere indice della presenza di patogeni.

Vale la pena sottolineare che un efficace indicatore microbiologico di contaminazione deve:

- a) poter sopravvivere sufficientemente a lungo nell'ambiente per consentire la sua evidenziazione. Di solito non oltre le 12-18 ore dal campionamento salvo spore.
- b) poter essere identificato con metodologie poco complesse e sufficientemente rapide.

I batteri che bene si apprestano a tale scopo sono i seguenti.

- **Coliformi**

I microrganismi considerati indicatori di inquinamento fecale che vengono ricercati comunemente per la definizione della qualità di acque di diversa tipologia e a diversa destinazione d'uso sono:

Coliformi totali

Coliformi fecali

Streptococchi fecali

- ***Salmonella***

Salmonella è ampiamente diffuso nell'ambiente. La sua presenza nell'acqua segnala inequivocabilmente l'esistenza di una contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (dilavamento di suoli contaminati).

- **Enterococchi**

Sono particolarmente sensibili alle ostili condizioni ambientali. La loro presenza rileva quindi al momento del campionamento un inquinamento d'origine fecale che si è prodotto in tempi recenti.

- **Spore dei Clostridi solfito riduttori**

La loro presenza in un campione di acqua è indice di una remota contaminazione fecale anche se per alcuni di essi la presenza è sia fecale, sia ambientale (possono

infatti trovarsi nell'ambiente circostante in seguito a qualche tipo di inquinamento umano).

- *Pseudomonas aeruginosa*

Si rileva in acque superficiali, reflue e marine, suoli, vegetazione e in generale in tutti gli ambienti umidi (*P. aeruginosa* risulta essere la specie microbica dominante). Si moltiplica facilmente, raggiungendo concentrazioni elevate, anche nelle acque oligotrofe (bassa riproduttività) dove la sua presenza è comunque difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale.

La sua presenza in acqua potabile è considerata indice di carenza di disinfezione nelle tecniche di lavorazione della stessa.

- *Stafilococco aureus*

E' una specie in grado di sopravvivere nell'ambiente esterno e rappresenta, nel controllo delle acque, un importante indice di contaminazione ambientale oltre che di efficienza di trattamento essendo resistenti all'azione del cloro.

- Carica batterica totale

Non è indice di nessun particolare inquinamento. E' solo la conta del numero complessivo di batteri (UFC) presenti rapportati ad 1ml di campione.

1.2.2 Legislazione:

Esistono numerose tipologie di acque e per ognuna di essa ci si deve aspettare composizioni chimiche diverse e microfauna diversa.

La legge "testo unico sulle acque 152-99" chiarisce delineando in modo univoco tutte le varie forme di acque esistenti, con limiti, norme e sanzioni nel caso di trasgressione.

Una parte della legge con i punti essenziali sarà ora riportata per chiarezza.

Sunto ed integrazione del "D. Lgs. 11 Maggio 1999 n°152 (Gazzetta Ufficiale n° 177 del 30/7/99 - Suppl. Ord. n° 146)"

Art.7 Acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile

1. Le acque dolci superficiali per essere utilizzate o destinate alla produzione di acqua potabile, sono classificate dalle regioni nelle categorie A1, A2 e A3 secondo le caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche di cui alla tabella 1.

2. A seconda della categoria di appartenenza, le acque dolci superficiali di cui al comma 1 sono sottoposte ai seguenti trattamenti:

- a) Categoria A1: trattamento fisico semplice e disinfezione;
- b) Categoria A2: trattamento fisico e chimico normale e disinfezione;
- c) Categoria A3: trattamento fisico e chimico spinto, affinazione e disinfezione.

[...]

4. Le acque dolci superficiali che presentano caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche qualitativamente inferiori ai valori limite imperativi della categoria A3 possono essere utilizzate, in via eccezionale, solo nel caso in cui non sia possibile ricorrere ad altre fonti di approvvigionamento e a condizione che le acque siano sottoposte ad opportuno trattamento che consenta di rispettare le norme di qualità delle acque destinate al consumo umano.

Seguiranno ora delle tabelle tratte dalla legge con i limiti massimali dei principali parametri microbiologici che devono contraddistinguere ogni tipologia di acqua.

Il numero a fianco ad ogni parametro segnala la posizione reale posseduta nella tabella originaria nella legge.

Tabella 1: Caratteristiche microbiologiche di qualità per acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile

N°	Parametro	Unità di misura	A1 G	A1 I	A2 G	A2 I	A3 G	A3 I
1	pH	unità pH	6,5-8,5	-	5,5-9	-	5,5-9	-
35	Domanda chimica ossigeno (COD)	mg/L O ₂		-	-	-	30	-
37	A 20°C senza nitrificazione domanda biochimica di ossigeno (BOD ₅)	mg/L O ₂	< 3	-	< 5	-	< 7	-
43	coliformi totali	/100 mL	50	-	5000		50000	
44	coliformi fecali	/100 mL	20	-	2000	-	20000	-
45	streptococchi fecali	/100 mL	20	-	1000	-	10000	-
46	salmonelle	-	assenza in 5L	-	assenza in 1L	-	-	-

Legenda: I = Imperativo G = Guida

Tabella 2: Valori limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura.

N°	SOSTANZE	unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in pubblica fognatura
1	pH		5,5-9,5	5,5-9,5
7	BOD5 (come O ₂)	mg/L	< 40	< 250
8	COD (come O ₂)	mg/L	< 160	< 500
50	<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del (...) del totale	
			50%	80%

Tabella 3: Limiti di emissione per le acque reflue urbane ed industriali che recapitano sul suolo

N°	SOSTANZE	unità di misura	(il valore della concentrazione deve essere minore o uguale a quello indicato)
1	pH		6 – 8
5	BOD ₅	mg O ₂ /L	20
6	COD	mg O ₂ /L	100
38	Saggio di tossicità su <i>Daphnia magna</i>	LC5024h	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale
39	<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale

Vi è una classificazione delle analisi in 3 gruppi in base alle loro caratteristiche:

Tabella 4: Suddivisione dei parametri di analisi secondo 3 gruppi

PARAMETRI I GRUPPO
pH, colore, materiali totali in sospensione, temperatura, conduttività, odore, nitrati, cloruri, fosfati, COD, DO (ossigeno disciolto), BOD ₅ , ammoniaca
PARAMETRI II GRUPPO
ferro disciolto, manganese, rame, zinco, solfati, tensioattivi, fenoli, azoto Kjeldhal, coliformi totali e coliformi fecali.
PARAMETRI III GRUPPO
fluoruri, boro, arsenico, cadmio, cromo totale, piombo, selenio, mercurio, bario, cianuro, idrocarburi disciolti o emulsioni, idrocarburi policiclici aromatici, antiparassitari totali, sostanze estraibili con cloroformio, streptococchi fecali e <i>salmonelle</i> .

Il punto di prelievo per i controlli è immediatamente a monte del punto di scarico sul suolo. Per gli impianti di depurazione naturale (lagunaggio, fitodepurazione) il punto di scarico corrisponde a quello all'uscita dall'impianto.

Gli scarichi aventi grandi portate devono in ogni caso essere convogliati in corpo idrico superficiale, in fognatura o destinati al riutilizzo. Per gli scarichi delle

acque reflue urbane valgono gli stessi obblighi di controllo e di autocontrollo previsti per gli scarichi in acque superficiali.

Il numero dei controlli è dato fino ad uno scarico di 2000 m³ al giorno 4 volte l'anno mentre oltre uno scarico di 2000 m³ al giorno 8 volte l'anno.

1.3 GENERALITA', MICRORGANISMI RICERCATI E ASPETTI LEGISLATIVI DEL VINO:

Dalla fermentazione del mosto d'uva, praticata dai lieviti e in parte dai batteri, si ottiene quella bevanda conosciuto semplicemente come vino.

Le analisi su questo alimento sono indispensabili per capire se la filtrazione, necessaria per asportare la flora vinificatrice, sia stata eseguita correttamente. La fase della filtrazione è necessaria per eliminare tutti i residui e per bloccare la fermentazione del vino e quindi arrestare tutti i processi metabolici che potrebbero andare a modificare ulteriormente caratteristiche organolettiche che hanno già raggiunto la maturità voluta. Il vino, per essere conservato a lungo, deve essere stato sottoposto ad un'ottima filtrazione ed essere stato definito stabile secondo determinati parametri chimici.

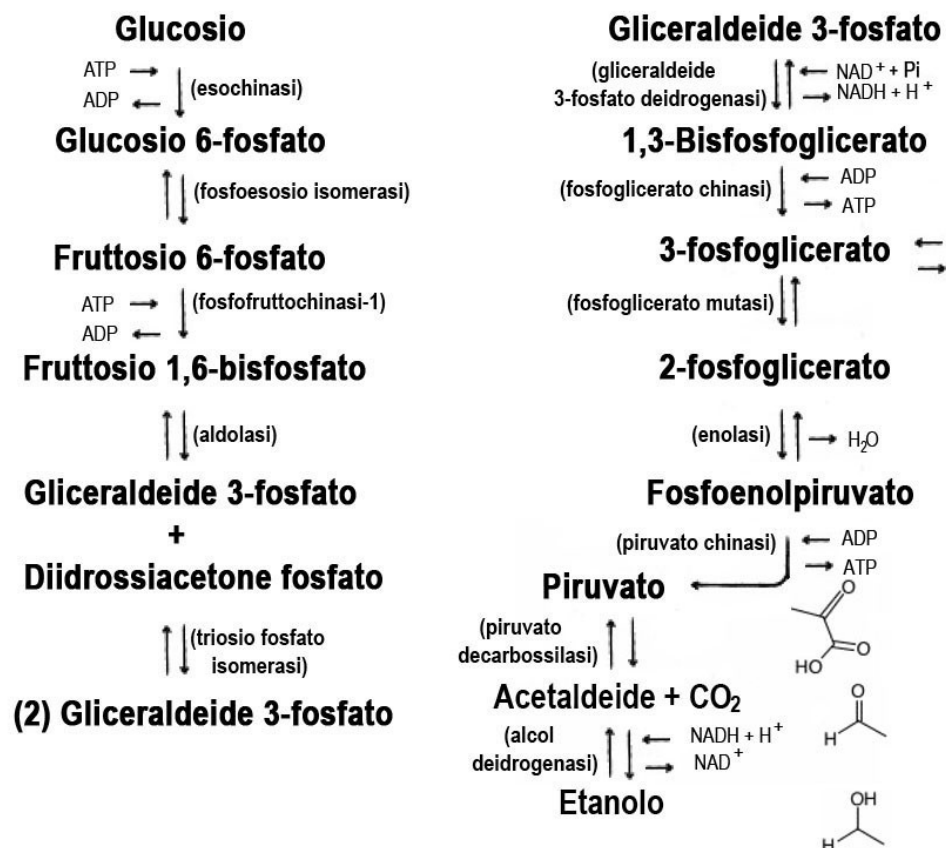
Accenni sulla fermentazione:

Il processo prende il nome di fermentazione dal latino fervere, bollire.

Inizialmente i lieviti messi nel substrato di coltura (esempio nel mosto) svolgono una respirazione aerobiotica, utilizzando cioè l'ossigeno dell'aria, trasformando gli zuccheri in acqua ed anidride carbonica. Poi dall'interno della massa, per mancanza di ossigeno, i lieviti passano alla fermentazione sfruttando l'energia degli zuccheri, ossidandoli anaerobicamente in alcol etilico ed anidride carbonica.

FERMENTAZIONE ALCOLICA

X 2



La prima fase è la glicolisi in cui un enzima trasportatore di elettroni, cioè un NAD, si riduce, poiché acquista l'elettrone. In più, parte dell'energia che si libera è immagazzinata da due molecole di ATP per molecola di glucosio.

A questo punto la fermentazione si differenzia dal processo della respirazione in quanto essendo l'ambiente anaerobico, cioè privo di ossigeno, le molecole di piruvato, provenienti dalla glicolisi, non possono entrare nel ciclo di Krebs e vengono invece decarbossilate ad acetaldeide e poi ridotte ad etanolo ed anidride carbonica con l'ossidazione del NAD.

La fermentazione alcolica nel suo complesso può così essere esemplificata:

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2$$

Il lievito in respirazione anaerobica trasforma 100g di zucchero in 51,1g di alcool con un rendimento in volume del 65.5%. Durante la fermentazione producono prodotti secondari (glicerina, acido acetico, acido succinico..) e diversi altri prodotti metabolici che contribuiscono a caratterizzare le proprietà organolettiche del prodotto finito.

1.3.1 Microrganismi ricercati

La normale flora è costituita da lieviti, che producono la vera fermentazione, e batteri, che con metabolismi diversi generano metaboliti secondari.

Nel vino si ricerca generalmente il numero di batteri e lieviti contenuti in 1ml di campione. Infatti le analisi vengono fatte per verificare l'efficienza della filtrazione subita dal vino.

Oltre ai lieviti e batteri naturali che sono presenti abitualmente (eliminati più o meno bene dalla filtrazione) si va a determinare un particolare tipo di lieviti della specie *Brettanomyces* e i batteri acetici e lattici.

- Batteri lattici:

Provocano almeno tre "malattie" del vino.

Il girato, causato dalla degradazione dell'acido tartarico con formazione di acido lattico, acido acetico e CO_2 . Il vino perde acidità fissa ed aumenta l'acidità volatile. Al gusto diventa molle e piatto, il colore dei rossi perde la vivacità e tende al bruno. Il girato attacca quindi i vini con scarsa acidità.

L'amaro invece colpisce soprattutto i vini a bassa gradazione ed è caratterizzata dal gusto amaro che dà al vino. I batteri lattici attaccano la glicerina e formano acido lattico, acido acetico ed altri acidi.

L'agrodoce o fermentazione mannitica dà il classico spunto lattico. Colpisce i vini non completamente fermentati dove i batteri lattici metabolizzano gli zuccheri dando origine ad ac. lattico ed ac. acetico. Da qui il sapore dolce ed acido allo stesso tempo.

Tutte queste malattie sono facilmente evitabili usando razionalmente SO_2 . Esiste anche l'utilizzo del lisozima che degrada la parete dei gram+. Non può però sostituire SO_2 , data la sua inefficacia contro i batteri gram-.

Attenzione particolare è da dare all'aumento dell'acidità volatile che, unitamente alla capacità d'alcuni batteri di sottrarre nutrimento ai lieviti, è una delle cause di ritardo o blocco della fermentazione.

- Batteri acetici:

I batteri acetici, se messi in condizioni opportune, possono indurre la acescenza nel vino: hanno bisogno di aria per cui si sviluppa solo dove il recipiente è stato chiuso male e la vasca è scolma. È un'alterazione che produce un velo sulla superficie del vino che assume diversi aspetti: bianco, molto sottile oppure più

spesso ed increspato e di lenta formazione. Il vino tende ad avere una concentrazione di acido sempre maggiore che ne compromette la qualità. I batteri ossidano l'alcol del vino e lo trasformano in acido acetico: portano alla formazione dell'acetato di etile, attore principale dello spunto acetico, per l'unione di acido acetico ed etanolo. Questo passaggio è testimoniato chimicamente anche da acidità volatile elevata, diminuzione degli acidi fissi (malico e lattico) e dalla conversione del glucosio in acido gluconico.

Tipici batteri acetici sono: *acetobacter* (vino) e *gluconobacter* (mosto).

Ricerca e distinzione tra acetici e lattici:

Sfruttando la caratteristica di presenza o assenza di catalasi (enzima riducente), si riesce facilmente a distinguere i batteri lattici (catalasi negativi) dai batteri acetici (catalasi positivi).

Nel caso di colonie anomale si cerca di fare analisi più approfondite e verificarne almeno il genere. Se il genere identificato contiene al suo interno microrganismi potenzialmente pericolosi allora si procede alla identificazione con test rapidi.

- *Brettanomyces*:

Il *Brettanomyces* è un lievito di contaminazione e di alterazione del vino alla cui presenza è associata la comparsa di gravi deviazioni organolettiche.

Questo microrganismo è pressoché ubiquitario nell'ambiente di cantina, dove trova le condizioni ideali per il suo sviluppo e la sua crescita, colonizzando tutti quei punti che risultano di difficile pulizia. Riesce a moltiplicarsi utilizzando anche pochissime quantità di zuccheri residui presenti nel vino.

Brettanomyces presenta una buona tolleranza all'alcool; la sua crescita viene inibita dall' SO_2 e dalle basse temperature, mentre la presenza di ossigeno e di un pH elevato sono invece fattori favorevoli al suo sviluppo. Sono quindi i vini più importanti ad essere a rischio: la vinificazione di uve ben mature, le frequenti ossigenazioni per favorire una buona evoluzione dei polifenoli, l'uso di contenitori di legno di età diverse, i lunghi tempi di élevage (maturazioni in botti di legno), sono tutte condizioni favorevoli allo sviluppo del lievito.

L'insorgenza del difetto è associata ad un unico descrittore definito "brett-character", tipicamente descritto come sudore di cavallo, urina di topo.

I composti responsabili di questo difetto sono gli etilfenoli, il più importante dei quali è il 4-etilfenolo, sviluppato a partire dagli acidi cinnamici presenti nel vino.

L'eliminazione di *Brettanomyces* è un'operazione difficoltosa, soprattutto nel caso di contenitori di piccole dimensioni di legno, materiale che offre una naturale protezione al lievito e risulta di difficile lavaggio e sanitizzazione.

In alcuni casi la contaminazione può protrarsi fino all'imbottigliamento.

La prevenzione dello sviluppo di *Brettanomyces* in un vino si basa sull'applicazione di alcune semplici linee guida: rigorosa igiene della cantina e della bottaia, solfitazione regolare di tutti i vini in stoccaggio, sanitizzazione radicale o, se non è possibile, eliminazione dei contenitori contaminati.

1.3.2 Legislazione:

La regolamentazione nel settore enologico è piuttosto articolata ma riguarda complessivamente solo l'aspetto chimico. Gli aspetti microbiologici non sono inglobati in una vera legge.

Infatti non esistono veri limiti per il vino. E' una questione di "buona condotta".

Ovvero se il vino contenesse microrganismi in quantità non idonee in breve tempo esso stesso sarebbe alterato organoletticamente e quindi non commerciabile.

2 MATERIALI E METODI

2.1 EFFICACIA DEL METODO DI INOCULO IN PIASTRA PER L'ANALISI DELL'ACQUA

Si sono eseguite delle prove per verificare qual è il miglior metodo per eseguire le semine in piastra. Un sistema molto semplice, quasi banale ma che ci ha permesso di confermare un dato che già potevamo dedurre da un esperimento fatto qualche anno fa in un altro istituto.

Il problema nel caso dell'acqua si ricerca nella presenza di microrganismi piuttosto in difficoltà e molto stressati in quanto non trovano i nutrienti necessari per il proprio ciclo vitale. Quindi la vitalità che questi possiedono è piuttosto ridotta e si rischia di perderne parecchi quando si esegue una semina che non ne tenga conto. Un altro problema è da localizzarsi sul metabolismo degli stessi microrganismi che possono essere aerobi o anaerobi. Ovviamente se noi insemenziamo superficialmente perdiamo tutti i batteri anaerobi, facendo il contrario perderemo invece gli aerobi.

Insomma tutta una serie di problemi che mette dubbi su come poter eseguire nel migliore modo possibile la semina.

Si sono perciò eseguite diverse prove con le tre tecniche classiche:

- Iniezione (0,25ml di campione disperso in 1ml di soluzione fisiologica)
- Spatolamento (0,25ml di campione)
- Filtrazione tramite membrana (0,25ml di campione in 100ml di soluzione fisiologica eseguito in più lavaggi)

Le piastre così seminate si sono poi incubate a 36°C per 48 ore.

Il campione utilizzato corrisponde a due campioni di acqua di cui però non si può dare la provenienza. Uno maggiormente e l'altro meno contaminato.

La prova si basa su un inoculo di 0,25ml per ogni piastra. Questo è stato il valore limite per ottenere un buon risultato su tutte le semine. Infatti per la semina per spatolamento immaginare più di 0,25ml inizia ad essere una semina improponibile in quanto presenterebbe problemi tecnici e sfalsamento di risultati. Nonostante siano, invece, pochi i quantitativi per la filtrazione su membrana si è visto che lavando bene le pareti dell'apparecchio filtrante con la soluzione fisiologica (100ml) si sono comunque ottenuti valori in linea e piuttosto riproducibili.

Avere eseguito le semine con quantitativi diversi di campione avrebbe non poco sfalsato i risultati, in particolare riportare ogni risultato sotto una stessa unità di misura sarebbe stato una grossa leggerezza. Si è quindi scelto questo metodo che per quanto artificioso sembra l'unico in grado di dare risultati maggiormente seri e critici.

2.2 ANALISI MICROBIOLOGICA ACQUA:

L'acqua destinata al consumo umano viene sottoposta, normalmente, a trattamenti di disinfezione che causano un aumento di microrganismi 'stressati' o danneggiati in modo non irreversibile, nell'ambito della flora eterotrofa da cui è contraddistinta.

E' perciò opportuno che qualunque metodologia analitica, destinata alla valutazione delle caratteristiche microbiologiche di un campione di acqua, preveda procedure di rivivificazione dei germi stressati verosimilmente presenti. Nel mio stage ho dovuto mettere a punto un procedimento, il più standard possibile, che potesse garantire la massima ripetibilità dei risultati.

Dalla legge di cui si parla nel paragrafo 1.3.2 è tratta parte di questa tabella riassuntiva rielaborata con le metodologie previste da 29/03- IRSA-CNR Metodi analitici per le acque.

Analisi	Parametro	Metodi di misura
1	<i>Salmonella</i>	<p>Metodo MF (Membrana Filtrante); Filtrare 1000 e 5000 mL di campione attraverso membrana filtrante. Se la torbidità non consente di filtrare la quantità richiesta di campione, utilizzare idoneo prefiltro. Incubare il filtro (e l'eventuale prefiltro) in acqua peptonata a temperatura ambiente per 6 ore.</p> <p>Passare nei seguenti terreni:</p> <p>a) Arricchimento su terreno di Brodo Rappaport Vassiliadis (incubare a 36°C per 24-48 ore);</p> <p>b) Dai predetti terreni ed alle scadenze temporali indicate eseguire semine isolanti sui seguenti terreni: SS-Agar (incubare a 36°C per 24 ore); Hektoen Enteric Agar (incubare a 36°C per 24 ore)</p> <p>Le colonie sospette devono essere sottoposte ad identificazione.</p>
2	Coliformi fecali	<p>Metodo MF; Filtrare mL 100 di campione e/o sue diluizioni attraverso membrana filtrante. Incubare su m-FC-Agar a 44±0,2°C per 24 ore in bagnomaria. Contare le colonie blu. Riportare il valore a 100 mL di campione.</p> <p>Confermo la presenza di <i>E.Coli</i> con semina su Mac Conkey Sorbitol Agar e ulteriore Test API per verificarne il tipo.</p>
3	Coliformi totali	<p>Metodo MF; Filtrare mL 100 di campione e/o sue diluizioni attraverso membrana filtrante. Incubare su m-Endo-Agar LES per 24 ore a 36 ±1°C. Contare le</p>

		colonie rosse. Riportare il valore a 100 mL di campione.
4	Streptococchi fecali (enterococchi)	Metodo MF; Filtrare mL 100 di campione (e/o sue diluizioni) attraverso membrana filtrante. Incubare su Slanetz e Bartley-Agar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ore. Leggere le colonie rosa e rosso scuro/marrone al centro. Riportare il valore a 100 mL di campione.
5	Spore Clostridi Solfito riduttori	Metodo MF; Filtrare mL 100 di campione e/o sue diluizioni attraverso membrana filtrante. Incubare su SPS-Agar per 24 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ in giara di anaerobiosi. Contare le colonie di colore nero con alone nero per la presenza di FeS.
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Metodo MF; Filtrare mL 100 di campione e/o sue diluizioni attraverso membrana filtrante. Incubare su Cetrimide Agar per 24 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Contare le colonie dotate di caratteristica colorazione verde.
7	<i>Stafilococcus aureus</i>	Metodo MF; Filtrare mL 100 di campione e/o sue diluizioni attraverso membrana filtrante. Incubare su Baird Parker Agar Base per 24 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Contare le colonie dotate di caratteristica colorazione nera.
8	Carica batterica totale (CBT)	Metodo per spatolamento. Dopo le opportune diluizioni si semina 1ml di campione su PCA Agar. Incubare per 48h a 36°C . Contare tutte le colonie cresciute

La procedura è standard e si basa su filtrazione su membrana con porosità 0,45 micron di un'aliquota d'acqua.

Tutta la procedura è da eseguirsi sotto cappa a flusso laminare per avere il minor rischio possibile di inquinamenti.

Si utilizza una struttura filtrante in acciaio facilmente utilizzabile e lavabile che può essere sterilizzato per ogni utilizzo agevolmente con flambate ripetute eseguite con il bunsen.

Descrizione e note sui terreni:

Saranno ora descritti per ogni parametro, a cui si richiama la numerazione, la composizione dei terreni, la lettura delle piastre e precisioni.

Nella composizione dei terreni saranno indicati come fattore selettivo (*s*), fattore differenziale (*d*), arricchimento (*a*).

1) -Composizione Acqua peptonata (g/l):

Peptone 10; sodio cloruro 5; disodio idrogeno fosfato 9; potassio di idrogeno fosfato 1,5; pH finale 7,2.

-Composizione brodo Rappaport Vassiliadis(g/l):

Peptone di soia 5; sodio cloruro 8 (*s*); potassio diidrogenato fosfato 1,6; magnesio cloruro 40(mg); verde bachelite (40mg); pH finale 5,2.

Presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofita, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. E' indispensabile per la riproduzione di *Salmonella* con la contemporanea inibizione degli altri batteri.

Si utilizza il brodo Rappaport Vassiliadis al posto del brodo di Selenite in quanto è molto meno pericoloso e non richiede procedure particolari per la sua preparazione.

-Composizione terreno SS Agar (g/l):

Peptone 10.0; lattosio 10.0 (*d*); sali biliari (*s*) 8.5; sodio citrato (*s*) 10.0; sodio tiosolfato 8.5; ammonio ferro(III) citrato 1.0; verde brillante (*s*) 0.0003; rosso neutro (*indicatore di pH*) 0.025; agar-agar 12.0.

Terreno selettivo e differenziale. *Salmonella* e altri microrganismi lattosio non fermentanti appaiono come piccole colonie, opache, incolore o traslucide.

-Composizione terreno Hektoen Enteric Agar (g/l):

Peptone 12; Estratto di lievito 3; Sali biliari 9 (*s*); Lattosio (*d*) 12; Saccarosio (*d*) 12; Salicina 2 (*d*); Sodio cloruro 5; Sodio iposolfito 5; Citrato ferrico ammoniacale 1,5; Agar 13,5; Blu di bromotimolo 64(mg); Fucsina acida 40(mg); pH finale 7,6.

Il terreno, selettivo e differenziale, permette di distinguere facilmente la flora che fermenta lattosio, saccarosio e salicina, da quella che non fermenta tali zuccheri.

Il tiosolfato e il citrato in caso di colonie positive formano Fe_2S_3 per la produzione di H_2S che si presenta come un annerimento del terreno stesso.

2) Composizione terreno m-FC-Agar (m-Faecal Coliform) (g/l):

Triptosio 10; Proteose peptone n. 3 o polipeptone 5; Estratto di lievito 3; Sodio cloruro 5 (*s*); Lattosio 12,5; Sali di bile 1,5; Blu di anilina 0,1 (*d*); Agar 15; pH 7,4.

Reidratare in acqua distillata contenente 10 mL di acido rosolico (*s*) all'1% in NaOH 0,2 N. Non sterilizzare. Le colonie positive sono di colore blu.

-Composizione terreno Mac Conkey Sorbitol Agar (g/l):

Agar 15; Cristallvioletto 0,001; Peptone di carne 20; Rosso neutro 0,03 (*d*); Sali biliari n. 3 1,5; Sodio cloruro 5 (*s*); Sorbitolo 10; Cefixime 0,05 (*s*); pH: 7,1 +/- 0,2.

3) Composizione terreno m-Endo-Agar LES (g/l):

Estratto di lievito 1,2; fosfato bipotassico 3,3; sodio solfito 1,6; casitone 3,7; fosfato monopotassico 1,0; fucsina basica 0,8 (*s*); tiopeptone 3,7; NaCl 3,7; agar 15; triptosio 7,5; sodio desossicolato 0,1; lattosio 9,4 (*d*); sodio lauril solfato 0.05 (*d*); pH finale 7,2.

Per la preparazione sciogliere la polvere in acqua distillata contenente il 2% d'etanolo, non potendolo riscaldare eccessivamente e utilizzandolo senza sterilizzarlo. Per evitare inoltre la degradazione di alcune delle sostanze presenti nel terreno utilizzarlo il giorno stesso della preparazione.

E' un terreno selettivo e differenziale. Le colonie positive sono di colore rosso con caratteristica lucentezza metallica in seguito alla precipitazione della fucsina basica e al metabolismo acido dei batteri stessi.

4) Composizione terreno Slanetz e Bartley (g/l):

Triptosio 20; Estratto di lievito 5; Destrosio 2; Dipotassio idrogeno fosfato 4; Sodio azide 0,4; Agar 15; pH 7,2±0,2.

Ad 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 10g di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC), miscelando con cura. Non sterilizzare.

5) Composizione terreno SPS agar (Sulphite Polimixin Sulphadiazine) (g/l):

Tryptone 15,0; estratto di lievito 10,0; citrato ferrico (*d*) 0,5; solfito di sodio (*d*) 0,5; sodio sulfodiazina (*s*) 0,12; polimixina B solfato (*s*) 0,01; agar 15,0; pH finale 7,4. Sterilizzazione a 121°C per 15 minuti.

Il terreno è selettivo e differenziale. La polimixina B solfato è un antibiotico che inibisce lo sviluppo a tutti gli altri batteri, mentre la sulfodiazina inibisce lo sviluppo a tutti i Clostridi non enterotossici. La presenza di citrato ferrico nel terreno mette in evidenza la formazione di solfuro il quale precipita sotto forma di solfato ferroso.

6) Composizione terreno Cetrimide Agar (Pseudomonas Selective Agar) (g/l):

Peptone gelatina 16; Caseina idrolisata 10; Solfato di potassio anidro 10; Cloruro di magnesio anidro 1,4; Glicerolo 10mL; Agar 15; Cetrimide (cetiltrimetilammoniobromuro) (*s*) 0,2; Acido nalidixico (*s-d*) 15mg.

Contiene come sostanza selettiva il cetrimide. L'acido nalidixico oltre ad essere un battericida aumenta la performance di *Pseudomonas*. Le colonie positive sono verdi irregolari e richiedono conferma. *P.aeruginosa* è l'unica del Genere che produce piocianina, viene quindi fatta la conferma su terreno King in cui viene favorita la produzione del pigmento.

7) Composizione terreno Baird Parker Agar Base (g/l):

Tryptone 10; litio cloruro 5; estratto di carne 5; agar 20; estratto di lievito 1; sodio piruvato 10; glicina 12; pH finale 6,8.

Autoclavare a 121°C per 10 minuti, raffreddare a 50°C ed aggiungere 50 ml di Emulsione di tuorlo d'uovo (*d*) e tellurito di potassio (*s*) al 3,5% per ogni litro.

L'emulsione di tuorlo d'uovo verrà utilizzata solamente da *S. aureus* grazie ad un enzima che solo lui possiede: la fosfoproteinlipasi che degrada la lipovitellina del tuorlo dando luogo ad un alone di chiarificazione attorno alle colonie.

In caso di colonie nere si deve procedere alla prova di conferma: colorazione di Gram; ossidazione del glucosio; test della coagulasi.

8) Composizione terreno PCA (plate count agar) (g/l):

Estratto di lievito 2,5 digerito pancreatico di caseina 5,0 destrosio 1,0 agar 15,0 pH finale del terreno 7.0.

Si contano tutte le colonie indistintamente.

2.3 ANALISI BOD E COD ACQUA:

Il parametro del BOD in un'acqua è molto importante. Consente di conoscere il consumo di ossigeno operato dai microrganismi e dunque, anche se non proprio esattamente, il carico di contaminazione che possiede.

Il BOD esprime la quantità di ossigeno necessaria per l'ossidazione bilanciata delle sostanze contenute in acqua nelle condizioni di buio a 20°C.

Ma il punto maggiormente sfruttato del BOD corrisponde al BOD₅. Ovvero la determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare prima e dopo incubazione di 5 giorni, al buio ed alla temperatura di 20°C.

La differenza tra le due determinazioni dà il valore del BOD₅ del campione espresso in mg/L.

La richiesta di ossigeno è data generalmente a tre classi di sostanze:

- composti organici (microrganismi che utilizzano ossigeno per le attività metaboliche)
- composti ossidabili dell'azoto (microrganismi che utilizzano azoto come fonte energetica; es. *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*)
- sostanze inorganiche (come il Fe, solfuri e solfati)

Le applicazioni riguardano acque naturali, di scarico poco inquinate con BOD₅ inferiore a 5mg/L con valori di pH tra 6,5 e 8,5 e con presenza di batteri.

Per la sua rilevazione si segue come scritto:

Raccogliere l'acqua da analizzare e mettere sotto analisi entro le 24 ore e comunque conservare il campione a 3-4°C per rallentare i processi metabolici.

Si mette quindi il campione in una bottiglia scura con tappo misuratore di variazione dell'ossigeno. La bottiglia va quindi posta a 20°C per 5 giorni. Allo scadere va fatta la lettura della variazione dell'ossigeno consumato.

COD

Il COD misura la quantità di ossigeno utilizzata per l'ossidazione di sostanze organiche e inorganiche contenute in un campione d'acqua a seguito di un trattamento con composti a forte potere ossidante.

Il COD ci dà un'indicazione del contenuto totale delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili e quindi della contaminazione antropica.

Questo parametro, come il BOD₅, viene principalmente usato per la stima del contenuto organico e quindi del potenziale livello di inquinamento delle acque naturali e di scarico. Un alto valore di COD comporta una riduzione dell'ossigeno disciolto nel corpo idrico ricettore e quindi una riduzione di capacità di autodepurazione e di sostenere forme di vita.

Rapporto BOD/COD

Il rapporto tra BOD/COD definisce un test significativo: esso, infatti, determina l'esatta biodegradabilità delle sostanze in essere nell'acqua. La legislazione non lo impone come obbligatorio.

Un alto valore del rapporto BOD/COD indica molto carbonio biodegradabile.

Al contrario un valore basso segnala una bassa percentuale di carbonio biodegradabile e un'elevata concentrazione di sostanze chimiche ossidabili.

Di solito un'acqua con rapporto BOD/COD uguale a 0 significa che è trattabile chimicamente ma non biologicamente; a 0,2 necessita di acclimatazione batterica per essere poi trattata con sistemi biologici; a 0,4-0,6 significa che è ben trattabile biologicamente. Per valori superiori ha bisogno di trattamenti biologici spinti.

2.4 ANALISI MICROBIOLOGICA VINO:

I metodi per la ricerca di lieviti e batteri nel vino invece sono riassunti nella seguente tabella:

Analisi	Parametro	Metodi di misura
1	Lieviti	Metodo MF Filtrare mL 200 di campione attraverso membrana filtrante. Incubare su WL nutrient agar per 48 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Le colonie si presentano medie (tra i 2 e 5mm) color panna di consistenza cremosa.
2	Carica batterica totale	Metodo MF Filtrare mL 200 di campione attraverso membrana filtrante. Incubare su agar MRS con aggiunta di tomato juice agar per 48 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Si contano tutte le colonie batteriche. Si verifica con il microscopio la loro natura e nei casi sospetti si procede facendo una prova della Catalasi e Gram.
3	verifica e carica <i>Brettanomyces</i>	Metodo MF Filtrare mL 20 di campione attraverso membrana filtrante. Incubare su terreno per <i>Brettanomyces</i> per 48 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Le colonie si presentano di color marroncino e di dimensioni piccole.

I quantitativi da filtrare sono uguali per rossi o bianchi ma nel caso di vini frizzanti sono 100ml per problemi inerenti alla formazione di schiuma

Descrizione e note sui terreni:

1) Composizione terreno WL Nutrient Agar (g/l):

Yeast extract 4.0; casein hydrolysate 5.0; D(+)glucose 50.0; potassium dihydrogen phosphate 0.55; potassium chloride 0.425; calcium chloride 0.125; magnesium sulfate 0.125; iron(III) chloride 0.0025; manganese sulfate 0.0025; bromocresol green 0.022; agar-agar 17.0; pH 5,5.

Sciogliere il terreno in una soluzione di 400 ml di tomato juice e 600 ml di acqua demineralizzata. Autoclavare a $121^\circ\text{C} \times 15$ minuti.

Una osservazione al microscopio a 400 ingrandimenti per avere la garanzia che le colonie in esame siano lieviti è però obbligatoria.

2) Composizione terreno MRS (Man Rogosa Sharpe) (g/l):

Peptone 10; Estratto di carne 8; Estratto di lievito 4; Destrosio 20; Potassio fosfato bibasico 2; Sodio acetato (\bar{s}) 5; Triammonio citrato (\bar{s}) 2; Magnesio solfato (\bar{a}) 0,2; Manganese solfato 0,05; Tween 80 (Sorbitan mono-oleato) (\bar{s}) 1 ml; Agar 10.

Il tween 80 è un tensioattivo che assieme al sodio acetato e al triammonio citrato agisce come sostanza selettiva. Il solfato di Magnesio è invece un arricchimento essenziale per la crescita dei lattobacilli.

3) La **composizione del terreno per *Brettanomyces*** non è resa pubblica in quanto protetta da copyright. La caratteristica inequivocabile della loro presenza è data dal tipico odore emanato simile al sudore di cavallo.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 EFFICACIA DEL METODO DI INOCULO IN PIASTRA PER L'ANALISI DELL'ACQUA

Legenda:

A: Semina per inclusione

B: Inoculo per insemmentamento superficiale.

C: Filtrazione su membrana

Acqua 1			
N° prova	A	B	C
1	61	79	70
2	54	75	55
3	75	68	49
4	81	91	78
5	62	105	66
6	69	60	75
7	77	96	80
8	59	88	56
9	80	82	58
10	68	64	64
media	68,6	80,8	65,1
min/max	54-81	60-105	49-80

Acqua 2			
N° prova	A	B	C
1	6	3	4
2	3	5	0
3	4	6	3
4	2	4	3
5	0	8	2
6	5	3	6
7	1	10	1
8	1	8	0
9	3	6	1
10	2	2	3
media	2,7	5,5	2,3
min/max	0-6	2-10	0-6

(Tutti i valori sono espressi in UFC/piastra)

Nel primo e nel secondo caso i risultati danno ragione all'insemmentamento superficiale confermandolo come il migliore sistema avendo una maggiore crescita generale di colonie.

Dunque questo è il metodo che maggiormente tende a rappresentare il campione in esame e quello che si dovrà di fatto utilizzare nelle procedure standard microbiologiche sull'analisi dell'acqua.

Il metodo sarà ovviamente utilizzato per le analisi della conta batterica totale ma non per tutte le analisi in quanto alcune di queste necessitano di altre condizioni per lo sviluppo. Infatti queste altre saranno eseguite con la tecnica della filtrazione su membrana.

3.2 DATI MICROBIOLOGICI DI VARIE TIPOLOGIE DI ACQUE

Di seguito verranno elencati in tabella tutti i dati raccolti nei test di laboratorio ottenuti per le varie tipologie di acque analizzate:

Tipologia acqua	Carica batterica totale a 22°C	Carica batterica totale a 36°C	Coliformi totali	Coliformi fecali	Streptococchi fecali	Salmonelle	Clostridi
Acqua acquedotto VR	0	0	1: gram-coccobacilli	0	0	0	0
Acqua acquedotto San Martino	0	0	0	0	0	0	0
Acqua acquedotto	0	1	0	0	0	0	0
Acqua acquedotto Bussolengo Pre-depuratore	3	8	61 no coliformi	0	0	0	0
Acqua Acquedotto Bussolengo	0	2	0	0	0	0	0
Acqua acquedotto Villafranca	0	0	1: gram-coccobacilli	0	0	0	0
Acqua pozzo privato	0	5	0	0	0	0	0
Acqua pozzo privato	0	3	12: no colif.	0	0	0	0
Acqua pozzo privato Villafranca	12	38	0	0	0	0	0
Acqua pozzo privato San Martino	5	12	0	0	0	0	0
Acqua pesca sportiva	2100	3100	500	100	70	1	0
Acqua pesca sportiva	1860	2510	400	85	59	1	0

Risultati espressi come UFC/ml. Nei 3 casi dei coliformi con colonie sospette il dato è da riferirsi su 100ml.

I risultati hanno confermato l'ottima qualità delle acque degli acquedotti di Verona. Anche le acque di pozzo hanno ottenuto un dato molto positivo: è chiaro infatti che, a parte casi isolati, hanno una qualità microbiologica molto vicina a quella degli acquedotti pur essendo esenti da tutti i vari trattamenti chimici specifici. Il dato è da ricercarsi nell'alta qualità delle falde veronesi e negli ottimi impianti esistenti al giorno d'oggi che con una serie di filtri installati nelle pompe riescono ad eliminare gli eventuali residui. Un dato anche che conferma l'ottima qualità, che se ne dica, dei sottosuoli di Verona, anche rafforzata dalle analisi chimiche che la esentano da concentrazioni pericolose di altre sostanze.

I risultati ottenuti con l'acqua proveniente dalla cava di pesca rientrano nei limiti previsti dalle legge. E' chiaro quindi che un'acqua di origine naturale a cielo aperto e a contatto con molto materiale organico non può avere gli stessi limiti di un'acqua potabile. Le analisi lo hanno confermato pur garantendo i limiti previsti.

Anche la presenza di *Salmonella* non deve essere causa di stupore in quanto è naturale che ve ne siano in piccole quantità in natura. L'importante è rimanere sotto i limiti di allarme.

3.3 ANALISI DELLA RICHIESTA DI OSSIGENO DELLE ACQUE: BOD E COD

Questi sono i risultati avuti per le diverse acque analizzate:

Tipologia acqua	BOD	COD	Tipologia acqua	BOD	COD
Acqua di acquedotto	1	0	Scarico lavaggio lavoraz. alimentari	990	250
Acqua di acquedotto	1	0	Scarico lavaggio lavoraz. alimentari	1300	315
Acqua di acquedotto	2	1	Scarico lavaggio lavoraz. alimentari	556	125
Acqua di acquedotto	0	0	Scarico lavaggio lavoraz. alimentari	1100	290
Acqua di acquedotto	1	0	Scarico lavaggio lavoraz. alimentari	980	250
Acqua di acquedotto	1	1	Scarico lavaggio lavoraz. alimentari	1500	350
Acqua di pozzo per uso umano	3	2	Acque di lavaggio allev. animali	400000	2500
Acqua di pozzo per uso umano	2	1	Acque di lavaggio allev. animali	600000	2700
Acqua di pozzo per uso umano	1	0	Acque di lavaggio allev. animali	200000	1800
Acqua di pozzo per uso umano	1	0	Acque di lavaggio allev. animali	85000	1200
Acqua di pozzo per uso umano	2	1	Acque di lavaggio allev. animali	60000	1000
Acqua di pozzo per uso umano	1	1	Acque di lavaggio allev. animali	500000	2500

BOD e COD sono espressi in mg/l

Si può notare come le acque destinate al consumo umano siano quasi del tutto prive di consumo di ossigeno sia microbico che chimico come deve essere.

L'acqua di lavaggio proveniente da allevamenti di animali presenta un BOD (e un rapporto BOD/COD) sempre molto elevato. Questo è da ricercarsi nell'abbondanza di materia organica presente. Essenziale perché possa essere scaricata in fognature pubbliche o corsi d'acqua è che sia depurata con trattamenti biologici spinti.

3.4 DATI OTTENUTI SU CAMPIONI DI VINO

Questi sono i dati ottenuti su un numero significativo di campioni di vino che si dividono equamente tra vini rossi e vini bianchi.

Il periodo preso in considerazione per queste analisi va da giugno a settembre per le analisi di lieviti e batteri, mentre da gennaio ad ottobre per le analisi sui *Brettanomyces*.

Non è stato possibile tenere conto del nome del produttore per evitare danneggiamento dell'immagine ad alcune cantine.

La colonna di *Brettanomyces* è del tutto indipendente dalle due colonne di batteri e lieviti invece inerenti allo stesso campione.

N °	BRETTANO.	BATTERI	LIEVI TI	N°	BRETTANO.	BATTER I	LIEVIT I
1	18954000	0	0	34	0	0	0
2	0	40	0	35	0	0	0
3	0	130	60	36	17	0	0
4	0	0	0	37	15	0	0
5	140	0	0	38	13	0	0
6	40	0	0	39	18	0	10
7	140	0	0	40	0	0	0
8	400	0	0	41	0	0	5
9	0	0	0	42	0	5	0
10	0	0	0	43	0	0	0
11	300	0	0	44	0	0	0
12	tappeto	60	10	45	0	0	0
13	260	0	0	46	Tappeto	0	0
14	tappeto	0	0	47	Tappeto	0	0
15	840	0	0	48	0	0	35
16	tappeto	0	0	49	Tappeto	tap lattici	0
17	0	0	0	50	Tappeto	75 lattici	0
18	0	0	0	51	0	tap lattici	0
19	tappeto	0	0	52	0	tap lattici	0
20	40000	0	0	53	Tappeto	tap lattici	0
21	tappeto	0	tappeto	54	0	tap lattici	0
22	0	0	60	55	0	tap lattici	0
23	2600	tap acetici	0	56	0	0	0
24	1600	130acetici	30	57	Tappeto	0	0
25	0	tap acetici	20	58	0	0	0
26	0	0	10	59	0	0	0
27	0	0	0	60	0	0	0
28	0	0	0	61	0	0	0
29	335000	10acetici	0	62	0	0	0
30	0	40acetici	0	63	4400	0	0
31	0	0	0	64	Tappeto	0	0
32	0	50acetici	0	65	0	0	0
33	0	0	20	66	0	0	0

N°	BRETTANO.	BATTERI	LIEVITI	N°	BRETTANO.	BATTERI	LIEVITI
67	0	0	0	77	4400	145	500
68	0	0	0	78	Tappeto	0	35
69	0	0	0	79		tappeto	tappeto
70	0	0	0	80		0	0
71	0	0	0	81		0	0
72	0	0	0	82		0	0
73	0	0	0	83		90acetici	0
74	tappeto	0	0	84		2400aceti	20
75	0	0	0	85		tap acetic	tappeto
76	0	0	0	86		0	0

Nota: Brettano sta per *Brettanomyces*.

Il numero di lieviti e batteri è stato trovato, salvo rare eccezioni, in quantità maggiore su vini di scarsa qualità. Vi è dunque molta approssimazione nella lavorazione di questi vini economici. Da notare, invece, proprio che sui vini di qualità superiore il numero di microrganismi è sempre stato ridottissimo o nullo. In particolare nei vini di qualità di lunga conservazione (vini invecchiati) non sono stati ritrovati microrganismi.

Dall'analisi dei numerosi campioni si sono potute trarre determinate conclusioni. Non vi è un diretto rapporto tra vino rosso/bianco e la sua contaminazione più o meno elevata.

Il tutto sembra dipendere dalle operazioni di filtrazione del vino, che può essere eseguito in modo accurato o meno. Nella rielaborazione sottostante verificherò che è data proprio da questo passaggio. Oltre a questo ovviamente molto è da ricondursi agli inquinamenti sorti in cantina per la presenza di *Brettanomyces*. Infatti nonostante la filtrazione sia stata portata a buon termine non esclude che il vino sia già compromesso dai lieviti dannosi. Non ha senso ricercare questi dopo la filtrazione in quanto non interessa la loro eliminazione se già hanno alterato il vino. Interessa invece controllare la loro presenza durante tutto il processo di vinificazione in modo da poter ricorrere ai ripari con qualche strategia prima che l'alterazione sia irrimediabile.

Nelle analisi per i *Brettanomyces* abbiamo che in 10 mesi 31 su 78 campioni sono positivi. E' una analisi che si esegue quando le colonie di lievito presenti nella conta dei lieviti classica emanano un odore simile al sudore di cavallo oppure quando il vino stesso ha sentori molto dubbi. Questa alta percentuale (il 40%) di campioni positivi su quelli analizzati dà una certa garanzia che quando il vino emana strani puzzi la responsabilità spesso, una volta su due, è proprio di questo lievito.

Invece nella totalità dei campioni esaminati in 10 mesi (all'incirca 500) si ha una percentuale di contaminati con *Brettanomyces* pari al 6%.

Nelle analisi lieviti-batteri abbiamo invece riscontrato che in 2 mesi si sono verificate:

22 rimanenze batteriche

16 rimanenze di lievito

Espandendo l'analisi ai 10 mesi presi in esame diventano:

110 rimanenze batteriche

80 rimanenze di lievito

Si deve notare come nei 10 mesi 40 casi su 430 campioni con la presenza di lieviti e batteri abbiano avuto la presenza di entrambi i microrganismi.

I batteri sono stati trovati con più numerosità e frequenza rispetto ai lieviti. Questo probabilmente è dovuto al fatto che nell'operazione di filtraggio il setto può non essere integro perfettamente e quindi microrganismi molto piccoli come i batteri riescono a passare nel vino più facilmente.

I lieviti, di dimensioni maggiori, invece tendono a essere fermati più facilmente e quindi li ritroviamo con minore frequenza.

Per verificare quanto detto riporto i dati ottenuti in tabella:

Dati	Presenz a Lieviti	Assenza Lieviti	Totale complessivo
Presenza Batteri	40	70	110
Assenza batteri	40	280	320
Conteggio compl	80	350	430

Faccio un test Chi quadrato con i valori attesi:

Dati	Presenz a Lieviti	Assenza Lieviti	Totale complessivo
Presenza Batteri	20	89	110
Assenza Batteri	59	260	320
Conteggio compl	80	350	430

Pongo H_0 : nessuna relazione tra presenza di batteri/lieviti

Pongo H_1 : relazione tra presenza di batteri/lieviti

Valore p-value ottenuto: $2,8 \times 10^{-8}$ ovvero una percentuale molto bassa.

Il valore denota un chiaro evento di dipendenza tra le 2 popolazioni e rappresenta quindi un qualcosa più che un semplice caso.

Infatti essendo significativamente sotto il 5%, limite per scartare la mia ipotesi, posso dire che le rimanenze batteriche e dei lieviti presenti nel vino sono gran parte da imputare alle cattive condizioni dei filtri utilizzati. La maggiore numerosità delle rimanenze batteriche è l'evidenza che se una lacerazione è piccola ($<1-2\mu m$) passeranno solamente batteri; se la lacerazione è maggiore ($>5-10\mu m$) troveremo sia batteri che lieviti. Assumendo che le piccole lacerazioni siano più frequenti riusciamo a spiegare questo risultato.

Da questa conclusione posso anche trarre che generalmente è probabile che trovando lieviti in un campione vi sia contemporaneamente la presenza anche di batteri.

Probabilmente estendendo l'analisi ad un campione molto più ampio queste differenze potrebbero enfatizzarsi.

4 CONCLUSIONE

Alla fine di questa esperienza ho potuto trarre alcune conclusioni con i dati ottenuti.

Sono riuscito a rielaborare un sistema che riuscisse ad ottenere il maggior numero di colonie in una conta microbica totale nell'analisi dell'acqua. Questo è l'insemenzamento superficiale.

Sono giunto ad una considerazione finale sulle acque di tipo locale raffrontate con quelle di acquedotto. Infatti i pozzi di Verona dal punto di vista microbiologico poco hanno da invidiare alle acque pubbliche. Anche dal punto di vista chimico (analisi effettuate dai colleghi di laboratorio), pur con le ovvie differenze e contenuti più alti di minerali, sono assolutamente potabili. Questo dimostra, anche se in modo generico e non mirato, che le falde sotterranee Veronesi godono di ottima salute.

Un terzo risultato è dato dall'ottenimento di dati enologici che descrivono come la filtrazione sia alla base di un vino di qualità o meno. Infatti la presenza di eventuali rimanenze di lievito o batteri sono da imputarsi, per gran parte, a tale passaggio. Un vino qualitativamente elevato in generale presenta un contenuto nullo o al più ridottissimo di rimanenze microbiche della fermentazione. Difficile anche ritrovare inquinamenti dati da *Brettanomyces*. Tutto questo grazie alla grande attenzione e accorgimenti che alla fine portano sulle tavole dei vini dagli elevati standard. Lo stesso non si può dire dei vini molto economici che invece fondano sul risparmio tutti i processi della vinificazione: dalla scelta delle uve all'imbottigliamento finale.

5 BIBLIOGRAFIA

- I principi di biochimica di Lehninger – David L. Nelson, Michael M. Coz. Edizioni Zanichelli.
- Conoscenze e applicazioni di microbiologia speciale – Alessandro Pavone, Roberta Paolucci. Edizioni Zanichelli.
- 29/03- IRSA-CNR (istituto di ricerca sulle acque - consiglio nazionale sulle ricerche) Metodi analitici per le acque
- venus.unive.it
- Istituto superiore di sanità www.iss.it
- <http://www.vinit.it>
- <http://www.fordras.us>
- <http://www.villamartina.it>
- <http://emdchemicals.com>

Ringrazio la mia famiglia, Michela e i miei amici.